



09/403085

REC'D	- 8 JUN 1998
WIPO	PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

**PRIORITY DOCUMENT**

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 06 MARS 1998

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cedex 08  
Telephone : 01 53 04 53 04  
Telecopie : 01 42 93 59 30

300-04180

BLANK PAGE

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI DATE DE REMISE DES PIÈCES 18 AVR 1997 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 97 04837 - DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75 DATE DE DÉPÔT 18 AVR. 1997		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  Monsieur André BOURGOUIN BEAUFOR IPSEN - S.C.A.F. 42 rue du Docteur Blanche 75016 PARIS									
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention		n° du pouvoir permanent LC 041 références du correspondant PH Cas 2 - CB téléphone 01 44 30 43 43 <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° _____ date _____									
Établissement du rapport de recherche <input checked="" type="checkbox"/> différé <input type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non											
Titre de l'invention (200 caractères maximum)  COMPOSITIONS PRESENTANT UNE LIBERATION PROLONGEE ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION											
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN B3-4-7-8-3-5-2-7-4 code APE-NAF _____ Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination  PHARMA BIOTECH		Forme juridique  Société Anonyme									
Nationalité (s) Française Adresse (s) complète (s)  Parc d'Activités du Plateau de Signes Ch. Dep. No. 402 83870 SIGNES		Pays  FRANCE									
En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>											
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée											
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission											
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE <table border="1"> <thead> <tr> <th>pays d'origine</th> <th>numéro</th> <th>date de dépôt</th> <th>nature de la demande</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° _____ date _____ n° _____ date _____											
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription)  André BOURGOUIN, Mandataire		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION 773 SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI									

BLANK PAGE

## Compositions présentant une libération prolongée et leur procédé de préparation

L'invention concerne tout d'abord une composition sous forme de microcapsules ou d'implants  
5 comprenant un excipient ou un mélange d'excipients polymères ou copolymères biodégradables  
de viscosité intrinsèque comprise entre 0,5 dl/g et 1,2 dl/g dans  $\text{CHCl}_3$  et au moins une  
substance active. L'invention concerne également une composition sous forme de  
microcapsules ou d'implants comprenant au moins un polymère ou un copolymère  
biodégradable de masse moléculaire élevée et au moins une substance active hydrosoluble  
10 présentant une surface spécifique élevée. De telles compositions seront utilisées pour obtenir  
une libération régulière de la substance active sur une période prolongée pouvant aller jusqu'à  
plus de trois mois.

Ces compositions et notamment les microcapsules trouvent leur utilisation principale en  
pharmacie, mais peuvent également être employées dans d'autres domaines, en particulier en  
15 agrochimie, c'est à dire dans le domaine phytosanitaire.

L'intérêt de l'administration de principes actifs sous forme de compositions à relargage  
progressif est connu depuis longtemps, qu'il s'agisse de produits pharmaceutiques classiques,  
par exemple de stéroïdes, de peptides ou de protéines (voir par exemple le brevet  
US 3,773,919 de Boswell), ou de produits à usage phytosanitaire. Les formulations adoptées  
20 peuvent prendre la forme de microparticules dans lesquelles le principe actif est incorporé dans  
un polymère ou un copolymère biodégradable tel le copolymère polylactide-co-glycolide  
(PLGA).

Il est apparu que notamment lorsqu'un mode de relargage relativement constant, en tout cas  
sans interruption, est recherché, mode qualifié par exemple de "monophasique" dans le brevet  
25 européen EP 58 481, des polymères de type PLGA de relativement bas poids moléculaire, donc  
de faible viscosité, sont nécessaires. On peut citer à ce sujet les brevets européens EP 21 234  
(voir l'exemple 8.B.2. décrivant un copolymère de viscosité intrinsèque de 0,5 dl/g),  
EP 52 510 où un copolymère ayant une viscosité de 0,38 dl/g dans l'hexafluoropropanol  
(HFIP) est testé *in vivo*, EP 26 599 qui décrit en exemple des polymères ayant des viscosités  
30 de 0,12 à 0,20 dl/g et revendique des polymères ayant une viscosité de 0,08 à 0,30 dl/g. Les  
polymères décrits dans ces brevets sont présentés comme conduisant à des compositions à  
relargage constant. Les compositions du brevet EP 26 599 peuvent par exemple contenir des  
agents de contrôle de fertilité.

Il est d'ailleurs important de noter à cet égard que lors de la procédure d'opposition relative au  
35 brevet européen EP 58 481, procédure encore en cours au jour du dépôt de la présente

demande, le déposant a limité sa revendication principale à des polymères de faible viscosité (inférieure à 0,3 ou 0,5 dl/g), seuls capables selon le déposant de permettre un relargage de type monophasique.

5 Par ailleurs, lorsqu'une période de relargage plus longue est recherchée, par exemple supérieure à un mois, des problèmes plus complexes apparaissent et une solution proposée par exemple par le brevet EP 0 302 582 consiste à mélanger plusieurs types de microcapsules constituées par des polymères de viscosités différentes.

10 Or la demanderesse vient de constater que l'utilisation de certains polymères de viscosité élevée peuvent convenir à la préparation de compositions à relargage progressif de longue durée. Il a été aussi constaté que l'utilisation de certains polymères conduit à des compositions ayant un profil de relargage monophasique pendant une durée très longue et sans période initiale ne comportant pas de libération ("dead period"). Il en est particulièrement ainsi de polymères ayant une viscosité intrinsèque de préférence au moins égale à 0,5 dl/g dans  $\text{CHCl}_3$ , et de façon plus préférentielle au moins égale à 0,6 ou 0,7 dl/g. Toutefois, la viscosité intrinsèque de ces  
15 polymères n'excédera pas 1,2 dl/g dans  $\text{CHCl}_3$ , et restera de préférence inférieure à 0,9 ou 1 dl/g. Lesdits polymères seront de préférence des PLGA avec un ratio lactide / glycolide 75 / 25.

20 Les polymères selon l'invention peuvent être préparés par les méthodes usuelles, notamment par ouverture des cycles lactide ou glycolide. Un tel procédé est décrit par exemple dans le brevet américain US 3,773,919.

Dans la présente invention, on peut également utiliser un mélange de polymères de viscosités élevées différentes, mais on préfère les compositions ne comportant qu'un seul polymère ou copolymère.

25 L'invention concerne donc tout d'abord une composition sous forme de microcapsules ou d'implants comprenant un excipient ou un mélange d'excipients polymères ou copolymères biodégradables de viscosité intrinsèque comprise entre 0,5 dl/g et 1,2 dl/g dans  $\text{CHCl}_3$  et une substance active ou un mélange de substances actives, ces microcapsules ou implants pouvant libérer la substance active ou le mélange de substances actives sur une période prolongée d'au moins 1 mois, de préférence, d'au moins 2 mois et, de façon plus préférentielle, d'au moins  
30 3 mois.

35 Par microcapsule, on entend également inclure les microsphères, microparticules, nanocapsules, nanosphères ou nanoparticules. Par polymère, on comprendra un polymère, un copolymère, ou un mélange quelconque de ces entités. Enfin, par substance active, on entend une substance active, un de ses sels ou un de ses précurseurs, ou un mélange quelconque de ces composés.

Les polymères ou copolymères utilisables dans cet aspect de l'invention peuvent être notamment des polymères tels ceux de l'acide lactique, l'acide glycolique, l'acide citrique ou l'acide malique, ou bien d'autres polymères biocompatibles comme l'acide poly- $\beta$ -hydroxybutyrique, les polyorthoesters, les polyorthocarbonates, les polyesters d'acide  $\alpha$ -cyanoacrylique, les polyoxalates d'alkylène tels le polyoxalate de triméthylène ou de tétraméthylène, les polyaminoacides, etc. Ils peuvent être aussi des copolymères comme le PLGA, le polystyrène, l'acide polyméthacrylique, des copolymères d'acide méthacrylique et d'acide acrylique, des polyaminoacides, des polymères d'anhydride maléique, l'éthylcellulose, le nitrocellulose, l'acétylcellulose, etc. Tous ces polymères ou copolymères peuvent être utilisés seuls ou en un mélange quelconque. De préférence, on utilisera le D,L-PLGA et, plus préférentiellement, un D,L-PLGA réalisé à partir de 70 à 80 % de D,L-lactide et de 20 à 30 % de glycolide. Un PLGA synthétisé à partir de 75 % de D,L-lactide et 25 % de glycolide conviendra particulièrement bien pour l'invention.

Un autre polymère particulièrement préféré pour l'invention est le L-PLGA, obtenu à partir de L-lactide et de glycolide. Par rapport au D,L-PLGA de même viscosité, le L-PLGA assure une libération plus lente et représente une alternative aux D,L-PLGA de plus haute viscosité.

Par ailleurs, on préférera en général, aux PLGA obtenus par ouverture de cycle avec des initiateurs hydrophobes, tels ceux de type alcool laurique, ceux obtenus par ouverture de cycle, avec des initiateurs hydrophiles, tels ceux de type acide lactique ou acide glycolique. L'indice d'acide, correspondant au nombre de milliéquivalents de KOH nécessaires par gramme de polymère pour neutraliser l'acidité libre, semble être le paramètre le mieux corrélé au caractère hydrophile ou hydrophobe du polymère. En effet, on constate que dès qu'il est inférieur à 1 (polymère hydrophobe), on obtient un profil de libération moins homogène, ce qui peut produire une interruption (ou "gap") de la libération après le pic de libération initial, alors que lorsqu'il est supérieur à 1,5 et, de préférence, supérieur à 2 (polymère hydrophile), le profil de libération correspond à une libération plus rapide et homogène. On préfère donc en général les polymères hydrophiles, car ils permettent d'éviter un "gap", mais si la libération est trop rapide, alors un polymère de même viscosité mais hydrophobe ne présentera pas ce "gap" et devra être préféré.

La charge en substance active ("core loading") des microcapsules selon l'invention, c'est à dire le rapport entre la masse du peptide pur encapsulé et la masse totale de la microcapsule, sera en général comprise entre 0 et 20 %, de préférence entre 2 et 15 %. Pour l'acétate de triptoréline, la charge sera de préférence inférieure ou égale à 10 % et, de façon plus préférentielle, comprise entre 4 et 8 % pour des formes permettant une libération sur une période d'environ 3 mois. Pour l'acétate de lanréotide, la charge sera de préférence comprise entre 10 et 20 %.

Pour des implants, la charge en substance active sera en général comprise entre 0 et 30 % et, de préférence, entre 15 et 25 %.

L'étape d'encapsulation peut être une étape dite de coacervation tel que décrite par exemple dans les brevets américain US 3,773,919 ou européen EP 52 510.

- 5 On peut également utiliser un procédé dit de fusion-extrusion tel que décrit dans le brevet européen EP 58 481 ou dans le brevet américain US 5,225,205, les produits obtenus étant ensuite éventuellement broyés selon les méthodes usuelles, pour aboutir à des microparticules.

10 Par ailleurs, on peut utiliser un principe actif hydrosoluble tel qu'un sel hydrosoluble d'un peptide, par exemple l'acétate. On peut également utiliser un sel insoluble d'une molécule soluble tel qu'un sel d'acide gras d'un peptide, par exemple, un pamoate de peptide tel que décrit dans le brevet britannique GB 2 209 937.

Les compositions obtenues par fusion-extrusion en utilisant les polymères selon l'invention peuvent également se présenter sous forme d'implants et être utilisées en tant que telles.

15 Ces implants sont de préférence des petits implants (mini-implants ou microimplants) d'un diamètre de l'ordre de 1 mm, par exemple entre 0,8 et 1,2 mm. La longueur de ces implants peut être comprise par exemple entre 10 et 35 mm, par exemple de l'ordre de 25 mm. Ces implants donnent des résultats très intéressants avec de faibles doses de principe actif, par exemple de l'ordre de 3 mg d'acétate de triptoréline par implant. De tels implants peuvent libérer le principe actif pendant une durée pouvant atteindre 3 mois.

20 En outre, il est apparu que la configuration du principe actif pouvait également avoir une influence sur la diffusion de ce produit. En particulier, lorsqu'un principe actif peut être obtenu sous une forme cristallisée ou amorphe, le choix de l'une ou l'autre forme n'est pas indifférent.

25 La demande de brevet EP 709 085 décrit des microcapsules comprenant un polymère et une substance active hydrosoluble et amorphe. Il y est en particulier question de l'importance d'obtenir des particules de substance active de petite taille, et de préférence de taille inférieure à 10  $\mu$ m. Cette demande ne comporte cependant aucun procédé de préparation d'édites particules et aucune mention n'est faite de l'effet de la surface spécifique des particules de principe actif sur le profil de relargage des compositions contenant ces particules. Or la demanderesse utilise déjà depuis 1986 des microcapsules comportant une substance active amorphe, l'acétate de triptoréline vendu sous la dénomination Decapeptyl 3,75 mg, dont la taille des particules est 30 d'environ 8  $\mu$ m seulement. Mais elle a constaté que la taille des particules n'est pas le seul paramètre déterminant pour favoriser une libération sur une période prolongée pouvant aller jusqu'à plus de trois mois.



La question du caractère amorphe ne se pose en principe pas pour des produits tels que les peptides ou les protéines dont le mode d'obtention, spécialement la lyophilisation, conduit dans la plupart des cas à un produit amorphe, ce qui est le cas pour le Decapeptyl 3,75 mg.

La littérature illustre abondamment ce phénomène et l'on peut citer notamment les articles suivants : Hsu, C.C. et al., *Pharmaceutical Research*, 12 (1), 69-77 (1995) ou Towns, J.K., *Journal of Chromatography, A*, 705 (1), 115-27 (1995).

L'invention concerne donc également une composition sous forme de microcapsules ou d'implants comprenant au moins un polymère ou un copolymère biodégradable de masse moléculaire élevée et au moins une substance active hydrosoluble présentant une surface spécifique élevée.

Ces microcapsules ou implants permettent un profil de relargage monophasique dans lequel le pic initial (ou "burst" en anglais) est réduit par rapport à certaines autres préparations utilisant un polymère de poids moléculaire plus faible, de sorte qu'elles permettent de libérer la substance active sur une période prolongée pouvant aller jusqu'à plus de trois mois.

Parmi les substances actives utilisables pour l'invention, on peut notamment citer les protéines, les peptides choisis par exemple dans le groupe constitué de l'acétate de triptoréline, l'acétate de lanréotide, d'un composé ayant une activité LH-RH tel que la triptoréline, la gosérelène, la leuproréline, la busérelène ou leurs sels, un antagoniste de LH-RH, un antagoniste de GPIIb/IIIa, un composé ayant une activité similaire à un antagoniste de GPIIb/IIIa, l'érythropoïétine (EPO) ou un de ses analogues, les différents interférons  $\alpha$ , l'interféron  $\beta$  ou  $\gamma$ , la somatostatine, un dérivé de la somatostatine tel que décrit dans le brevet européen EP 215 171, un analogue de la somatostatine tel que décrit dans le brevet américain US 5,552,520 (ce brevet comporte lui-même une liste d'autres brevets décrivant des analogues de la somatostatine qui sont incorporés par référence à la présente demande), l'insuline, une hormone de croissance, un facteur libérateur d'hormone de croissance (GRF), un facteur de croissance épidermique (EGF), une hormone malanocyte-stimulante (MSH), une hormone libératrice de thyrotropine (TRH) ou un de ses sels ou dérivés, une hormone stimulant la thyroïde (TSH), une hormone lutéinisante (LH), une hormone stimulant les follicules (FSH), une hormone parathyroïdienne (PTH) ou un de ses dérivés, un hydrochlorure de lysozyme, un fragment de peptide à N terminal (position 1—>34) de l'hormone PTH humaine, la vasopressine ou un de ses dérivés, l'oxytocine, la calcitonine, un dérivé de la calcitonine ayant une activité similaire à celle de la calcitonine, le glucagon, la gastrine, la sécrétine, la pancréozymine, la cholécystokinine, l'angiotensine, le lactogène du placenta humain, la gonadotropine chorionique humaine (HCG), l'enképhaline, le facteur stimulateur de colonies (CSF), un dérivé de l'enképhaline, l'endorphine, la kyotorphine, les interleukines, par exemple l'Interleukine 2, la tuftsine, la thymopoïétine, la thymosthymine, le facteur thymique humoral

(THF), le facteur thymique sérique (FTS), un dérivé du facteur thymique sérique (FTS), la thymosine, le facteur thymique X, le facteur de nécrose tumorale (TNF), la motiline, la bombésine ou un de ses dérivés tels que décrits dans le brevet américain US 5,552,520 (ce brevet comporte lui-même une liste d'autres brevets décrivant des dérivés de la bombésine qui  
5 sont incorporés par référence à la présente demande), la prolactine, la neurotensine, la dynorphine, la caeruleine, la substance P, l'urokinase, l'asparaginase, la bradykinine, la kallikréine, la facteur de croissance nerveuse, un facteur de coagulation sanguine, la polymixine B, la colistine, la gramicidine, la bacitracine, un peptide stimulant la synthèse protéique, un antagoniste de l'endothéline ou un de ses sels ou dérivés, un polypeptide intestinal vasoactif  
10 (VIP), l'hormone adrénocorticotropique (ACTH), un facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), une protéine morphogénétique osseuse (BMP), et un polypeptide inhibiteur gastrique (GIP). Toute autre substance active hydrosoluble, ou un de ses sels ou précurseurs, pourra également être utilisée par l'homme du métier s'il le juge utile.

De préférence, on utilisera un produit hydrosoluble, obtenu par salification sous forme de  
15 cation, avec par exemple l'acide acétique. On peut cependant utiliser un sel insoluble, comme indiqué ci-dessus.

Par peptide et/ou protéine, on entend aussi bien le peptide et/ou la protéine eux-mêmes que des fragments de ces peptides ou protéines pharmacologiquement actifs.

La substance active hydrosoluble telle qu'utilisée pour fabriquer des microcapsules ou des  
20 implants selon l'invention, et en particulier l'acétate de triptoréline, l'acétate de lanréotide, la goséréline, la leuproréline, la buséréline ou leurs sels, est obtenue de préférence par un procédé comportant principalement deux étapes :

- une étape de lyophilisation comprenant une trempe rapide d'une solution diluée de la substance hydrosoluble dans un milieu de température inférieure à  $-70^{\circ}\text{C}$  ;
- 25 - une étape de broyage ; de préférence, cette étape comprendra un broyage ultrasonique.

Par solution diluée de la substance active, on entend une solution ayant une concentration de ladite substance active inférieure à la moitié de la concentration de saturation, et de préférence inférieure à un quart de ladite concentration de saturation lorsque celle-ci est au moins égale à 200 g/l. Ce procédé permet d'obtenir une substance active présentant une surface spécifique  
30 élevée.

Pour la lyophilisation, on pourra par exemple congeler la solution dans un plateau baignant dans un bac d'azote liquide, avant de procéder à la lyophilisation proprement dite.

Lorsque le procédé sera appliqué à une substance active pour préparer des microcapsules ou des

implants à libération prolongée selon l'invention, la surface spécifique de la substance active, après lyophilisation mais avant broyage, sera de préférence supérieure à  $2 \text{ m}^2/\text{g}$ . De façon plus préférentielle, la surface spécifique de la substance active sera supérieure à  $3 \text{ m}^2/\text{g}$ , voire  $5 \text{ m}^2/\text{g}$ .

- 5 La surface spécifique de la substance active est un facteur favorable pour obtenir une libération sur une période prolongée, en particulier dans le cas des microcapsules. En effet, comme déjà évoqué, des particules d'une substance active de même taille mais de surfaces spécifiques différentes donneront avec le même excipient polymère des résultats tout à fait différents.

- 10 L'invention a donc également pour objet le procédé tel que décrit ci-dessus appliqué à une substance hydrosoluble biologiquement active. Elle concerne aussi la substance hydrosoluble biologiquement active tel qu'obtenue par le procédé, laquelle présente une surface spécifique élevée.

- Comme indiqué ci-dessus, les compositions selon l'invention trouvent leur usage de préférence dans le domaine pharmaceutique. Les compositions pharmaceutiques peuvent être administrées  
15 à un patient par différentes voies ; cependant, la voie préférée est la voie injectable sous-cutanée ou intramusculaire. Les microcapsules selon l'invention peuvent d'abord être suspendues dans un véhicule approprié destiné à l'injection, comme une solution aqueuse de chlorure de sodium ou une solution aqueuse de mannitol.

- A moins qu'ils ne soient définis d'une autre manière, tous les termes techniques et scientifiques  
20 utilisés ici ont la même signification que celle couramment comprise par un spécialiste ordinaire du domaine auquel appartient cette invention. De même, toutes les publications, demandes de brevets, tous les brevets et toutes autres références mentionnées ici sont incorporées par référence.

- Les exemples suivants sont présentés pour illustrer les procédures ci-dessus et ne doivent en  
25 aucun cas être considérés comme une limite à la portée de l'invention.

### **EXEMPLES :**

- Pour tous ces exemples, les viscosités inhérentes (IV) ont été mesurées selon les méthodes classiques de mesure du temps d'écoulement telles que décrites par exemple dans  
"Pharmacopée Européenne", 1997, pages 17-18 (méthode au tube capillaire). La surface  
30 spécifique de la substance active, lorsqu'elle a été mesurée, a été déterminée par la méthode dite méthode B.E.T. (absorption d'une monocouche d'azote sur la substance active), méthode bien connue de l'homme du métier.

Pour les exemples suivants, on appellera peptide "modifié" un peptide ayant subi le procédé de

lyophilisation selon l'invention, par opposition au peptide "non modifié", qui est lyophilisé de façon classique (sans trempe brutale à basse température).

**Exemple 1 :**

5 16,620 g d'acétate de triptoréline "non modifié" sont dissous dans 554 ml d'eau. La solution est congelée dans un plateau baignant dans un bac d'azote liquide, puis lyophilisée.

15,18 g d'acétate de triptoréline "modifié" sont ainsi obtenus avec un rendement de 91,34 %. Ce composé présente une surface spécifique de 4,7 m<sup>2</sup>/g contre 0,8 m<sup>2</sup>/g avant lyophilisation.

10 On réalise ensuite le broyage aux ultrasons de l'acétate de triptoréline : 15 minutes sont suffisantes pour obtenir des particules inférieures à 10 µm pour le peptide modifié (alors que 30 minutes sont nécessaires pour obtenir une telle granulométrie avec le peptide non modifié).

15 L'étape d'encapsulation est ensuite réalisée selon la méthode de coacervation telle que décrite dans les brevets européen EP 52 510 et américain US 3,773,919; au départ de 3,378 g de cet acétate de triptoréline modifié et broyé et d'une solution à 7,30 % de DL-PLGA (DL-PLGA composé de 75 % de DL-lactide et 25 % de glycolide, viscosité inhérente dans le chloroforme = 0,70 dl/g, indice d'acide = 1,61 meq KOH / g) dans du dichlorométhane. 390 ml d'huile de silicone ont été additionnés pour former des microcapsules par le procédé de coacervation. Ces microcapsules sont récupérées après immersion dans un bain d'heptane (22 l) et filtration sur membrane 10 µm.

**Exemple 2 :**

20 0,338 g d'acétate de triptoréline non modifié, de granulométrie égale à 8 µm après broyage aux ultrasons pendant 30 minutes, ont été additionnés sous agitation à une solution à 7,30 % de DL-PLGA dans du dichlorométhane (PLGA équivalent à celui décrit dans l'exemple 1). 40 ml d'huile de silicone ont été additionnés pour former des microcapsules qui sont par la suite précipitées dans un bain d'heptane (2 l) puis filtrées sur membrane 10 µm.

25 **Exemples 3 à 6 :**

0,338 g d'acétate de triptoréline modifié selon les conditions décrites dans le Tableau No. 1 ci-dessous, ont été additionnés, après broyage aux ultrasons, à une solution à 7,30 % d'un mélange 33,3 % / 33,3 % / 33,3 % de trois DL-PLGA (aux caractéristiques décrites dans le Tableau No. 2 ci-dessous) dans du dichlorométhane. 40 ml d'huile de silicone ont été  
30 additionnés pour former des microcapsules qui sont par la suite précipitées dans un bain d'heptane (2 l) puis filtrées sur membrane 10 µm.

Tableau No. 1

Exemple	Concentration g/l	Quantité acétate de triptoréline (g)	Quantité d'eau (ml)	Surface spécifique m <sup>2</sup> /g
3	200	3	15	4,4
4	150	3	20	4,7
5	100	3	30	4,8
6	50	3	60	7,3

La surface spécifique de l'acétate de triptoréline de départ (non modifié) est de 0,8 m<sup>2</sup>/g.

Les caractéristiques physico-chimiques des trois polymères mélangés sont réunies dans le  
5 Tableau No. 2 ci-après :

Tableau No. 2

Caractéristiques	PLGA No. 1	PLGA No. 2	PLGA No. 3
Ratio lactide / glycolide	DL PLGA 50:50	DL PLGA 75:25	DL PLGA 75:25
Viscosité inhérente dans DHCl <sub>3</sub> (dl/g)	0,47	0,61	0,70
Indice d'acide (meq KOH/g)	2,68	2,08	1,61

Exemple 7 :

22,560 g d'acétate de lanréotide non modifié sont dissous dans 752 ml d'eau. La solution est  
10 congelée dans un plateau baignant dans un bac d'azote liquide, puis lyophilisée. 21,75 g  
d'acétate de lanréotide modifié, de surface spécifique égale à 4,4 m<sup>2</sup>/g, sont obtenus avec un  
rendement de 96,41 %.

L'étape d'encapsulation est ensuite réalisée selon la méthode de coacervation telle que décrite  
dans les brevets européen EP 52 510 et américain US 3,773,919 ; au départ de 7,5 g de cet  
15 acétate de triptoréline modifié et broyé et d'une solution à 3,7 % de DL-PLGA (DL-PLGA  
composé de 50 % de DL-lactide et 50 % de glycolide, viscosité inhérente dans HFIP =  
0,55 dl/g) dans du dichlorométhane. 650 ml d'huile de silicone ont été additionnés pour  
former des microcapsules par le procédé de coacervation. Ces microcapsules sont récupérées  
après immersion dans un bain d'heptane (30 l) et filtration sur membrane 10 µm.

**Exemples 8 et 9 :**

Des microcapsules d'acétate de triptoréline ont été fabriquées avec DL-PLGA (DL-PLGA composé de 75 % de DL-lactide et 25 % de glycolide) de différentes masses moléculaires moyennes en poids (Mw). Les fabrications ont été effectuées selon le procédé décrit dans l'exemple 1 avec un acétate de triptoréline de surface spécifique égal à 4,7 m<sup>2</sup>/g.

Les paramètres physico chimiques des exemples 8 et 9 sont réunis dans le tableau ci-après :

Exemple	Mw THF	IV CHCl <sub>3</sub> (dl/g)	Indice d'acide (meq KOH/g)
8	58400	0,61	2,08
9	132650	0,93	1,80

**Exemple 10 :**

Des microcapsules ont été fabriquées selon le procédé décrit dans l'exemple 1 avec DL-PLGA (DL-PLGA composé de 75 % de DL-lactide et 25 % de glycolide ; masse moléculaire déterminée dans le THF : 80100 ; viscosité dans le chloroforme : 0,75 dl/g, indice d'acide = 0,40 meq KOH / g) à tendance hydrophobe.

**Exemple 11 :**

Des microcapsules ont été fabriquées selon le procédé décrit dans l'exemple 1, à partir d'un L-PLGA (L-PLGA composé de 75 % de L-lactide et 25 % de glycolide ; masse moléculaire dans le THF : 99260 ; viscosité dans le chloroforme : 0,78 dl/g, indice d'acide = 1,31 meq KOH / g) à tendance cristalline.

**Exemple 12 :**

A quatre parties, en poids, de poudre de D,L-PLGA (PLGA composé de 75 % de lactide et 25 % de glycolide ; masse moléculaire déterminée dans le THF : 103810 ; viscosité inhérente dans le chloroforme : 0,82 dl/g) on ajoute une partie, en poids, d'acétate de triptoréline.

On détruit les grumeaux par un tamisage sur une maille 400 µm, on mélange 20 minutes à 42 tours par minute et on extrude le mélange à 120° C avec une extrudeuse à vis, à travers une filière de 1 mm d'ouverture. On refroidit ensuite à l'air et on calibre par étirage (étireuse) à un diamètre final de 0,85 mm.

La richesse du mélange par unité de longueur (mm) est déterminée et on dose les microimplants à 3 mg de triptoréline en coupant les tiges d'extrudat à des longueurs calculées (ici, 24 mm).

Enfin, le poids de chaque microimplant est contrôlé.

**Etude des profils de libération de microcapsules selon l'invention :**

Afin d'illustrer l'intérêt de microcapsules selon l'invention, l'étude de leurs profils de libération *in vitro* a été réalisée.

- 5 Pour chacun des exemples 1 à 11, on mesure la libération de trois prises d'essai d'environ 25 mg de microcapsules, placées dans 4 ml de solution de chlorure de sodium à 0,9 %. On extrait après 1 heure, 1 jour et 4 jours de libération dans la solution maintenue à 37° C. On dose la triptoréline par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) par rapport à une gamme d'étalonnage en mode gradient dans le système acide trifluoroacétique (TFA). Pour  
10 obtenir la gamme d'étalonnage standard, on prépare une solution T<sub>1</sub> de la façon suivante : une prise d'essai voisine de 7,5 mg d'acétate de triptoréline de référence est placée dans une fiole de 50 ml ; on complète à 50 ml avec une solution d'acide acétique à 0,1 %. A partir de la solution T<sub>1</sub>, on prépare les solutions T<sub>2</sub> et T<sub>3</sub> en procédant comme suit : pour T<sub>2</sub>, on prélève 10 ml de solution T<sub>1</sub> et on complète à 20 ml avec la solution d'acide acétique à 0,1 %. Pour la  
15 solution T<sub>3</sub>, on prélève 1 ml de solution T<sub>1</sub> et on complète à 50 ml avec la solution d'acide acétique à 0,1 %.

La quantité d'acétate de triptoréline ou d'acétate de lanréotide libérée est déterminée en pourcentage par rapport à la quantité d'acétate de triptoréline ou d'acétate de lanréotide initialement présente (100 %), qui sert de référence.

- 20 Les résultats des tests *in vitro* sont résumés par le tableau ci-dessous :

Exemples	Taux de libération cumulé (%)		
	1 heure	1 jour	4 jours
1	8	16	27
2	9	47	57
3	10	45	67
4	10	37	65
5	9	41	66
6	8	30	55
7	3	14,5	28,3
8	11	40	67
9	2	4	6
10	5	12	14
11	1	2	2

Les résultats des tests *in vivo* sont parfaitement bien corrélés à ceux des tests *in vitro*. A titre d'exemple, des microcapsules de l'exemple 1, à la dose de 1,2 mg/kg, ont été injectées par voie intramusculaire à des rats. Un dosage plasmatique a révélé que le taux de triptoréline restait constamment supérieur à 0,1 ng/ml sur une période de plus de 90 jours. Des mêmes études  
5 menées sur des microcapsules de l'exemple 2 ont montré que le taux de testostérone restait constamment inférieur à 1 ng/ml sur une période de plus de 90 jours.

Les microimplants de l'exemple 12 ont été testés *in vivo* de la façon suivante : une dose totale de 3 mg de triptoréline a été injectée en intramusculaire sur 6 chiens Beagles (poids d'environ 12 kg) dans un muscle de la patte arrière de chacun des animaux. Un dosage plasmatique a  
10 révélé que le taux de triptoréline restait constamment supérieur à 0,1 ng/ml sur une période de plus de 90 jours.



## REVENDICATIONS

- 5    1. Composition sous forme de microcapsules ou d'implants comprenant un excipient ou un mélange d'excipients polymères ou copolymères biodégradables de viscosité intrinsèque comprise entre 0,5 dl/g et 1,2 dl/g dans  $\text{CHCl}_3$  et une substance active ou un mélange de substances actives, lesdites microcapsules pouvant libérer la substance active ou le mélange de substances actives sur une période prolongée pouvant aller jusqu'à trois mois.
- 10   2. Composition sous forme de microcapsules ou d'implants selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'excipient polymère ou copolymère biodégradable possède une viscosité intrinsèque supérieure à 0,6 dl/g dans  $\text{CHCl}_3$ .
- 15   3. Composition sous forme de microcapsules ou d'implants selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le polymère biodégradable est un copolymère de lactide et de glycolide (PLGA).
- 20   4. Composition sous forme de microcapsules ou d'implants selon la revendication 3, caractérisée en ce que le PLGA est préparé à partir de 75 % de lactide et de 25 % de glycolide.
- 25   5. Composition sous forme de microcapsules ou d'implants selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le polymère biodégradable est un copolymère de L-lactide et de glycolide.
- 30   6. Composition sous forme de microcapsules ou d'implants comprenant au moins un excipient ou un mélange d'excipients polymères ou copolymères biodégradables et au moins une substance active hydrosoluble présentant une surface spécifique élevée.
7. Composition sous forme de microcapsules ou d'implants selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la surface spécifique de la substance active est supérieure à 2 m<sup>2</sup>/g.
8. Composition sous forme de microcapsules ou d'implants selon la revendication 7, caractérisée en ce que la surface spécifique de la substance active est supérieure à 3 m<sup>2</sup>/g.
9. Composition sous forme de microcapsules ou d'implants selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la substance active est une protéine.

10. Composition sous forme de microcapsules ou d'implants selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la substance active est un peptide.

11. Composition sous forme de microcapsules ou d'implants selon la revendication 10, caractérisée en ce que le peptide est choisi dans le groupe constitué de l'acétate de triptoréline, l'acétate de lanréotide, d'un composé ayant une activité LH-RH tel que la triptoréline, la goséréline, la leuproréline, la buséréline ou leurs sels, un antagoniste de LH-RH, un antagoniste de GPIIb/IIIa, un composé ayant une activité similaire à un antagoniste de GPIIb/IIIa, l'érythropoïétine (EPO) ou un de ses analogues, les différents interférons  $\alpha$ , l'interféron  $\beta$  ou  $\gamma$ , la somatostatine, un dérivé de la somatostatine, un analogue de la somatostatine, l'insuline, une hormone de croissance, un facteur libérateur d'hormone de croissance (GRF), un facteur de croissance épidermique (EGF), une hormone melanocyte-stimulante (MSH), une hormone libératrice de thyrotropine (TRH) ou un de ses sels ou dérivés, une hormone stimulant la thyroïde (TSH), une hormone lutéinisante (LH), une hormone stimulant les follicules (FSH), une hormone parathyroïdienne (PTH) ou un de ses dérivés, un hydrochlorure de lysozyme, un fragment de peptide à N terminal (position 1—>34) de l'hormone PTH humaine, la vasopressine ou un de ses dérivés, l'oxytocine, la calcitonine, un dérivé de la calcitonine ayant une activité similaire à celle de la calcitonine, le glucagon, la gastrine, la sécrétine, la pancréozymine, la cholécystokinine, l'angiotensine, le lactogène du placenta humain, la gonadotrophine chorionique humaine (HCG), l'enképhaline, le facteur stimulateur de colonies (CSF), un dérivé de l'enképhaline, l'endorphine, la kyotorphine, les interleukines, par exemple l'Interleukine 2, la tuftsine, la thymopoïétine, la thymosthymiline, le facteur thymique humoral (THF), le facteur thymique sérique (FTS), un dérivé du facteur thymique sérique (FTS), la thymosine, le facteur thymique X, le facteur de nécrose tumorale (TNF), la motiline, la bombésine ou un de ses dérivés, la prolactine, la neurotensine, la dynorphine, la caeruleine, la substance P, l'urokinase, l'asparaginase, la bradykinine, la kallikréine, le facteur de croissance nerveuse, un facteur de coagulation sanguine, la polymixine B, la colistine, la gramicidine, la bacitracine, un peptide stimulant la synthèse protéique, un antagoniste de l'endothéline ou un de ses sels ou dérivés, un polypeptide intestinal vasoactif (VIP), l'hormone adrénocorticotropique (ACTH), un facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), une protéine morphogénétique osseuse (BMP), et un polypeptide inhibiteur gastrique (GIP).

12. Composition sous forme de microcapsules ou d'implants selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la substance active hydrosoluble est l'acétate de triptoréline.

13. Composition sous forme de microcapsules ou d'implants selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la substance active hydrosoluble est l'acétate de lanréotide.
14. Procédé de préparation d'une substance hydrosoluble présentant une surface spécifique élevée, comprenant les étapes suivantes :
- une étape de lyophilisation comprenant une trempe rapide d'une solution diluée de ladite substance hydrosoluble dans un milieu de température inférieure à  $-70^{\circ}\text{C}$  ;
  - une étape de broyage.
15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'étape de broyage comprend un broyage ultrasonique.
16. Procédé selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce que la solution diluée est une solution à une concentration inférieure à la moitié de la concentration de saturation.
17. Procédé selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce que la substance hydrosoluble présente une concentration de saturation d'au moins 200 g/l et que la solution diluée est une solution à une concentration inférieure à un quart de la concentration de saturation.
18. Substance active telle qu'obtenue par un procédé selon la revendication 14 ou 15.
19. Protéine selon la revendication 18.
20. Peptide selon la revendication 18.
21. Peptide selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué de l'acétate de triptoréline, l'acétate de lanréotide, d'un composé ayant une activité LH-RH tel que la triptoréline, la goséréline, la leuproréline, la buséréline ou leurs sels, un antagoniste de LH-RH, un antagoniste de GPIIb/IIIa, un composé ayant une activité similaire à un antagoniste de GPIIb/IIIa, l'érythropoïétine (EPO) ou un de ses analogues, les différents interférons  $\alpha$ , l'interféron  $\beta$  ou  $\gamma$ , la somatostatine, un dérivé de la somatostatine, un analogue de la somatostatine, l'insuline, une hormone de croissance, un facteur libérateur d'hormone de croissance (GRF), un facteur de croissance épidermique (EGF), une hormone melanocyte-stimulante (MSH), une hormone libératrice de thyrotropine (TRH) ou un de ses sels ou dérivés, une hormone stimulant la thyroïde (TSH), une hormone lutéinisante (LH), une hormone stimulant les follicules (FSH), une hormone parathyroïdienne (PTH) ou un de ses dérivés, un hydrochlorure de lysozyme, un fragment de peptide à N terminal (position 1—>34) de l'hormone PTH humaine, la vasopressine ou un de ses dérivés, l'oxytocine, la

5 calcitonine, un dérivé de la calcitonine ayant une activité similaire à celle de la calcitonine,  
le glucagon, la gastrine, la sécrétine, la pancréozymine, la cholécystokinine,  
l'angiotensine, le lactogène du placenta humain, la gonadotropine chorionique humaine  
(HCG), l'enképhaline, le facteur stimulateur de colonies (CSF), un dérivé de  
l'Interleukine 2, la tuftsine, la thymopoiétine, la thymosthymline, le facteur thymique  
humoral (THF), le facteur thymique sérique (FTS), un dérivé du facteur thymique sérique  
(FTS), la thymosine, le facteur thymique X, le facteur de nécrose tumorale (TNF), la  
10 motiline, la bombesine ou un de ses dérivés, la prolactine, la neurotensine, la dynorphine,  
la caeruléine, la substance P, l'urokinase, l'asparaginase, la bradykinine, la kallikréine,  
la facteur de croissance nerveuse, un facteur de coagulation sanguine, la polymixine B, la  
colistine, la gramicidine, la bacitracine, un peptide stimulant la synthèse protéique, un  
antagoniste de l'endothéline ou un de ses sels ou dérivés, un polypeptide intestinal  
vasoactif (VIP), l'hormone adrénocorticotropique (ACTH), un facteur de croissance  
15 dérivé des plaquettes (PDGF), une protéine morphogénétique osseuse (BMP), et un  
polypeptide inhibiteur gastrique (GIP).

22. Acétate de triptoréline tel qu'obtenu par un procédé selon la revendication 14 ou 15.

23. Acétate de lanréotide tel qu'obtenu par un procédé selon la revendication 14 ou 15.